昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2011, 54(12): 1348 - 1353 ISSN 0454-6296

不同培养基上繁殖的昆虫病原线虫格氏线虫表皮蛋白的差异

刘 华, 姚 庆, 袁京京, 曾洪梅*, 邱德文
(中国农业科学院植物保护研究所, 农业部作物有害生物综合治理重点实验室, 北京 100081)

摘要: 表皮蛋白(surface coat proteins, SCPs)是格氏线虫 *Steinernema glaseri* 克服寄主免疫系统的关键因素, 能够抑制昆虫免疫反应, 促进线虫的侵染。为了进一步研究表皮蛋白抑制昆虫免疫的作用机理和线虫与寄主间的相互关系, 我们比较分析了不同培养基繁殖的格氏线虫表皮蛋白的差异。我们用人工培养基和大蜡螟 *Galleria mellonella* 末龄(5 龄)幼虫分别培养得到格氏线虫侵染期幼虫, 利用酒精提取表皮蛋白。SDS-PAGE 和非变性 PAGE 分析显示, 大蜡螟来源的格氏线虫的表皮蛋白具有更多的蛋白条带。体外和体内的裂解血细胞实验表明, 大蜡螟来源的格氏线虫的表皮蛋白表现出强烈的裂解血细胞活性, 而人工培养基来源的格氏线虫的表皮蛋白活力不明显; 且具有裂解血细胞活性的表皮蛋白为诱导表达型蛋白。不同培养基来源的格氏线虫的表皮蛋白组成的差异和活性的不同, 表明格氏线虫表皮蛋白的产生受线虫培养条件影响较大。

关键词: 格氏线虫; 表皮蛋白; 培养基; 人工培养基; 大蜡螟; 血细胞; 裂解活性
中图分类号: Q965.8 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)12-1348-06

Difference of surface coat proteins in entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) reared on different culture media

LIU Hua, YAO Qing, YUAN Jing-Jing, ZENG Hong-Mei*, QIU De-Wen (Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Surface coat proteins (SCPs) of *Steinernema glaseri* were proved to play important roles in defeating the host immune system. SCPs suppress insect immune response and promote infection of entomopathogenic nematodes. In this study, influences of different culture media on SCPs were investigated, which may provide useful information for further studying the immunosuppressive mechanisms of SCPs and the relationship between entomopathogenic nematodes and their hosts. Infective juveniles of *S. glaseri* were reared on an artificial medium and the last (5th) instar larvae of *Galleria mellonella*, respectively, and the SCPs from these nematodes were extracted with ethanol. SDS-PAGE and native-PAGE analysis of SCPs indicated that SCPs from *S. glaseri* nematodes reared on *G. mellonella* displayed more protein bands than those from the nematodes reared on the artificial medium. SCPs from *S. glaseri* nematodes reared on *G. mellonella* larvae had intensive lytic activity against hemocytes of *G. mellonella* both *in vitro* and *in vivo*, while SCPs from the nematodes reared on the artificial medium showed weak lytic activity. Moreover, hemocyte lytic SCPs were found to be inducible proteins. Variation of components and activity of SCPs from nematodes reared on different culture media demonstrates that the production of SCPs mainly depends on culture environments.

Key words: *Steinernema glaseri*; surface coat proteins (SCPs); culture media; artificial medium; *Galleria mellonella*; hemocyte; lytic activity

昆虫病原线虫是多种昆虫的寄生天敌, 是一类新型的生物杀虫剂, 它具有杀虫范围广、能主动寻找寄主、在 48 h 内致死寄主等优点(Kaya and Gaugler, 1993; Adams and Nguyen, 2002)。昆虫病

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071741); 农业部"948"项目(2011-G4)
作者简介: 刘华, 男, 1986 年生, 湖北仙桃人, 博士研究生, 研究方向为药物工程, E-mail: hlps92@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hmzeng@caas.net.cn
收稿日期 Received: 2011-06-07; 接受日期 Accepted: 2011-11-21

原线虫专一性较高，对人畜、植物及有益生物无害（Gaugler *et al.*, 1997）。它能通过昆虫体表开口进入其身体，侵入寄主血腔，并释放肠道内的共生菌致死寄主（Burnell and Stock, 2000）。

在长期的进化进程中，昆虫形成了独特的先天性免疫系统，分为细胞免疫和体液免疫，能够有效地防御病原生物的入侵和感染（Hoffmann, 1995; Kanost *et al.*, 2004）。格氏线虫 *Steinernema glaseri* 突破日本金龟子 *Popillia japonica* 组织屏障进入血腔后要在 4 ~ 6 h 后才开始释放共生菌（Wang *et al.*, 1995），在此期间，线虫必须依靠自身的能力克服昆虫的免疫才能逃避寄主的吞噬、包被作用等（Wang *et al.*, 1994）。昆虫病原线虫身体的最外层结构被称为表皮（surface coat），是与昆虫免疫系统直接接触的界面（Blaxter *et al.*, 1992; Shamseldean *et al.*, 2007）。Wang 和 Gaugler（1999）发现，格氏线虫之所以能逃避昆虫免疫，是因为其表皮上有具备免疫抑制功能的表皮蛋白（surface coat proteins, SCPs），这类蛋白能够保护线虫不被日本金龟子的血细胞所黑化包被，引起血细胞浓度下降，并抑制血细胞对外源物的吞噬作用。Li 等（2007, 2009）也发现，格氏线虫的表皮蛋白不仅能保护注入东方金龟子 *Exomala orientalis* 体内的异小杆线虫，提高其存活率，还能引起东方金龟子血细胞的凋亡。

目前关于格氏线虫表皮蛋白的报道还较少，对其基因克隆和作用机理等的研究有重要意义。本研究通过人工培养基和大蜡螟 *Galleria mellonella* 分别培养了格氏线虫，提取了表皮蛋白，比较了不同培养基对表皮蛋白的组成和裂解血细胞活性的影响，分析了有免疫抑制活性的表皮蛋白的表达方式，为进一步研究表皮蛋白奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

格氏线虫 NC32 品系由美国罗格斯大学（Rutgers University）的 Randy Gaugler 教授惠赠。

大蜡螟为本室以人工配制饲料培养的实验室种群，实验中所用大蜡螟均为健康且大小均一（体重 240 ~ 280 mg）的末龄（5 龄）幼虫。

BCA 试剂盒购自 Pierce 公司；Grace's 昆虫培养基购自 Invitrogen 公司；抗生素混合物、胎牛血清和牛血清白蛋白购自 Sigma 公司；蛋白质分子量 marker 购自 GE healthcare 公司；液体 A6 培养基为本室自配（15 g 胰蛋白胨，10 g 蔗糖，5 g NaCl，0.5 g KH_2PO_4，1 000 mL 水，pH 7.2）；其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2　大蜡螟繁殖线虫

在无菌的 9 cm 直径培养皿内铺一层滤纸，放入 30 头大蜡螟末龄幼虫，再向培养皿内加入 1 mL 格氏线虫悬液，25℃放置 48 h。在 15 cm 直径的大培养皿内倒扣一个滤纸包裹的 5 cm 直径培养皿（形成滤纸岛），将加入线虫后 24 - 48 h 之间死亡的大蜡螟取出，75% 酒精表面消毒后摆放在滤纸岛上，25℃放置 2 d。向大培养皿中加入少量 0.1% 福尔马林，以刚好浸湿滤纸为宜，继续放置于 25℃，并保持皿内潮湿状态。待大量 3 龄带鞘侵染期线虫从大蜡螟中游出后，向大培养皿中加入适量 0.1% 福尔马林，在皿内形成 2 ~ 3 mm 的浅水层。每 2 d 收集从滤纸岛游到大培养皿中的侵染期线虫，蒸馏水反复清洗后保存于 8℃备用。

1.3　人工培养基繁殖线虫

将格氏线虫共生菌接种于液体 A6 培养基中，在 28℃以 180 r/min 培养 48 h。匀浆器彻底打碎鸡蛋、猪肝、猪油和水（质量比为 3∶3∶1∶3），加入适量的体积约为 1 cm^3 海绵块充分吸收匀浆液，随后将海绵分装入 500 mL 锥形瓶中，120℃高压灭菌 40 min。向海绵中接入培养好的格氏线虫共生菌，室温避光培养 3 d。用 0.5% 次氯酸钠和 0.1% 硫柳汞消毒格氏线虫，向海绵中接入线虫，继续室温培养 30 d 获得侵染期线虫。取出培养瓶中海绵，在通气的自来水中浸洗海绵 1 h，纱布过滤掉海绵，反复用自来水清洗含侵染期线虫的滤液，彻底除去培养基残渣后线虫保存于 8℃备用。

1.4　线虫表皮蛋白的提取

两种方式培养的格氏线虫表皮蛋白的提取采用同一方法，具体过程参考 Wang 和 Gaugler（1999）进行，略加改动。用 0.5% 次氯酸钠处理收集的侵染期线虫（约 2×10^7 条/L）15 min，依次用自来水和蒸馏水清洗处理后的线虫，洗净次氯酸钠后在室温下用空气泵通气处理线虫悬液 48 h。细纱布过滤线虫除去蒸馏水，将线虫在预冷的 35% 乙醇中孵育 30 min；细纱布过滤掉线虫，收集滤液，冷冻于 -80℃冰箱过夜。用冷冻干燥仪处理表皮蛋白提取液至干粉状态，向干粉中加适量 PBS（137 mmol/L NaCl, 7.8 mmol/L Na_2HPO_4, 1.5 mmol/L KH_2PO_4, 2.7 mmol KCl, pH 7.3）配成悬液，将悬液冰上放置 30 min，其间颠倒混匀 2 ~ 3 次促进溶解，然后在

4℃以 10 400 r/min 离心 20 min，吸取上清即得表皮蛋白溶液。表皮蛋白溶液的蛋白浓度采用 BCA 试剂盒检测。对收集的表皮蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳（浓缩胶 5%、分离胶 12%）和非变性 PAGE 电泳（浓缩胶 5%、分离胶 8%）以检测蛋白。

1.5 表皮蛋白体外裂解血细胞活性检测

取大蜡螟末龄幼虫放置冰上 10 min，用 75% 酒精体表消毒后剪去前足，吸取血淋巴。将 200 μL 血淋巴加至有 500 μL 预冷抗凝缓冲液（98 mmol/L NaOH，145 mmol/L NaCl，17 mmol/L EDTA，41 mmol/L 柠檬酸，pH 4.5）的离心管中。轻柔混匀后 4℃下 2 900 r/min 离心 5 min，吸去上清后加入 0.5 mL Grace's 昆虫培养基（含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素混合物）重悬血细胞。离心清洗血细胞 2 次，用血细胞计数板计数后再加 Grace's 昆虫培养基调整细胞浓度为 2×10^5/mL。取血细胞悬浮液加入无菌 96 孔板中，每孔 100 μL，置 28℃温箱避光培养 1 h。向培养的血细胞中分别加入 PBS，10 μg/mL 牛血清白蛋白（BSA）、10 μg/mL 表皮蛋白（人工培养基来源）和 10 μg/mL 表皮蛋白（大蜡螟来源）各 5 μL，每个样品加入 5 个孔中，混匀后继续放入 28℃温箱培养，在加样后 0.5，2 和 6 h 分别在显微镜下观察血细胞裂解情况。每处理重复 3 次。

1.6 表皮蛋白体内裂解血细胞活性检测

取大蜡螟末龄幼虫放置冰上 10 min，用 75% 酒精体表消毒。用微量进样器向大蜡螟腹腔体内分别注射 PBS、10 μg/mL BSA、10 μg/mL 表皮蛋白（人工培养基来源）和 10 μg/mL 表皮蛋白（大蜡螟来源）各5 μL，每个样品注射 30 头大蜡螟，然后将大蜡螟放入 28℃温箱。在注射后定时（0.5，2，4，6，12 和24 h）从各处理组中各取 5 头大蜡螟，冰上麻痹后用 75% 酒精体表消毒，每头剪前足取血10 μL，与 100 μL 抗凝缓冲液混匀后用血细胞计数板计数细胞。每处理重复 3 次。

1.7 数据统计与分析

表皮蛋白体内裂解血细胞活性的结果数据采用 SPSS 16.0 软件进行差异显著性检验，绘图采用 Excel 2003 进行。

2 结果与分析

2.1 不同培养基上繁殖的格氏线虫表皮蛋白的成分差异

采用大蜡螟和人工培养基繁殖并获得了侵染期格氏线虫，用酒精溶液分别提取了表皮蛋白，电泳分离蛋白。如图 1（A）所示，两种培养方式所得表皮蛋白成分都较复杂，蛋白条带都在 10 个以上，各蛋白分子量主要在 66 kD 以下。SDS-PAGE 结果还显示，两种来源的表皮蛋白的电泳条带差异较大，大蜡螟培养的格氏线虫表皮蛋白条带更多，人工培养基培养的格氏线虫表皮蛋白则含有几条高浓度的条带。在非变性 PAGE 中，大蜡螟来源的线虫表皮蛋白的主要条带也比人工培养基来源的多 2～3 条（图 1：B）。SDS-PAGE 和非变性 PAGE 结果均表明，不同培养基来源的格氏线虫表皮蛋白成分存在一定相似性，但大蜡螟来源的线虫表皮蛋白成分更丰富。

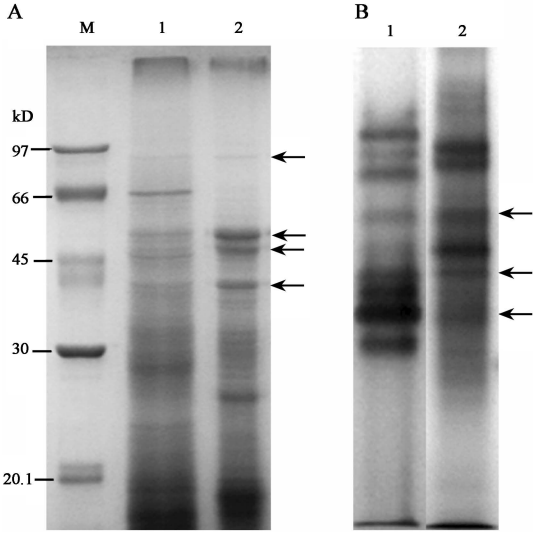

图 1 格氏线虫侵染期幼虫表皮蛋白的 SDS-PAGE（A）和非变性 PAGE（B）分析

Fig. 1 SDS-PAGE (A) and native PAGE (B) of SCPs from *Steinernema glaseri* infective juveniles

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：大蜡螟培养的格氏线虫表皮蛋白 SCPs from *S. glaseri* reared on *Galleria mellonella*；2：人工培养基培养的格氏线虫表皮蛋白 SCPs from *S. glaseri* reared on the artificial medium. 黑色箭头指示两条泳道中大小相同的条带。Black arrows indicate bands with the same size on two lanes.

2.2 不同培养基上繁殖的格氏线虫表皮蛋白体外裂解血细胞活性的差异

为了检测不同培养基对格氏线虫表皮蛋白免疫抑制活性的影响，我们检测了表皮蛋白在体外裂解大蜡螟血细胞的能力。如图 2 所示，在仅有 PBS、BSA 或人工培养基来源的表皮蛋白时，细胞培养板底部的血细胞在处理 6 h 后均无明显变化，形态正常；但大蜡螟来源的表皮蛋白在处理 2 h 后即使得血细胞边缘开始模糊，6 h 后血细胞已完全裂解。这一结果表明大蜡螟来源的格氏线虫表皮蛋白能直接裂解昆虫血细胞。

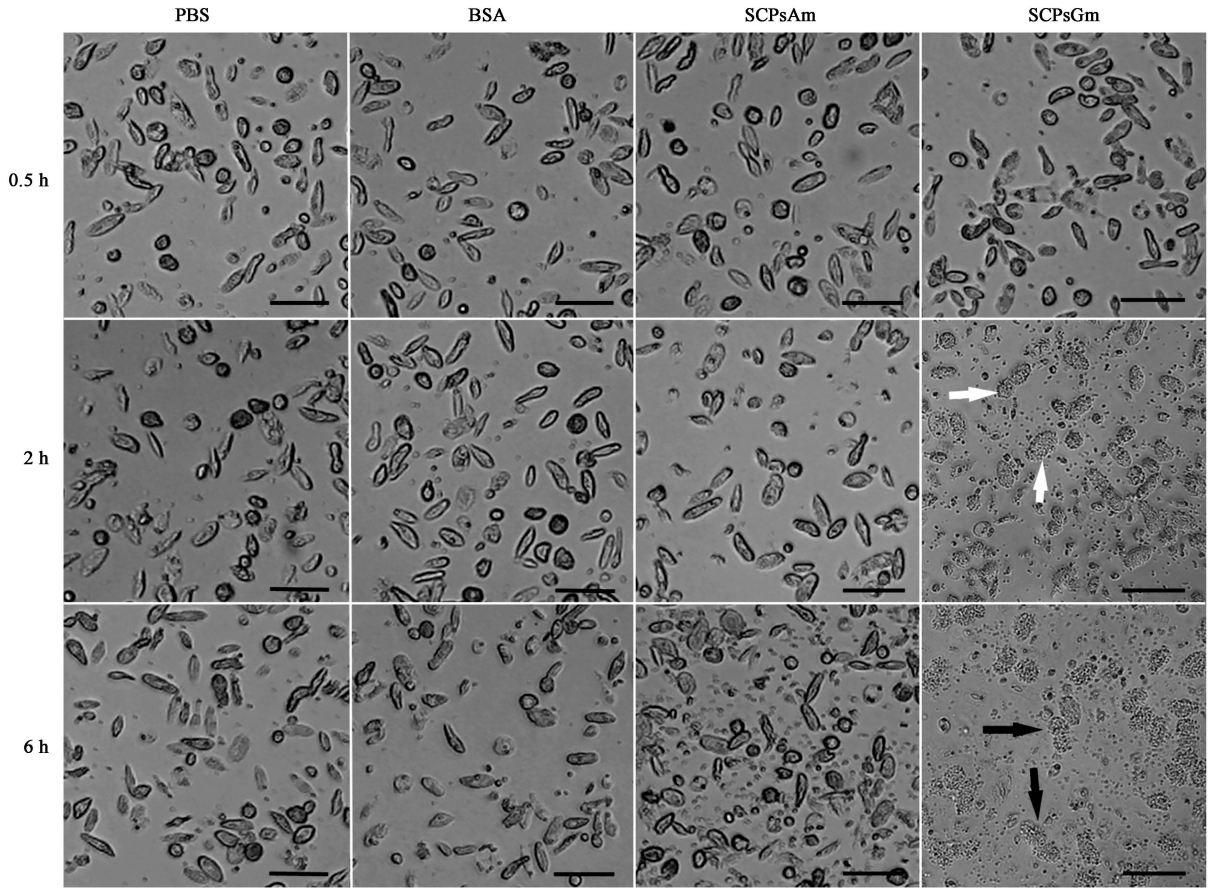

图 2　格氏线虫表皮蛋白体外裂解昆虫血细胞的活性分析

Fig. 2　Analysis of insect hemocyte lytic activity of SCPs from *Steinernema glaseri in vitro*

白色箭头指示正在裂解的血细胞，黑色箭头指示裂解完全的细胞。White arrows indicate hemocytes which are lysing, while black arrows indicate completely lysed hemocytes. 标尺 Bar = 20 μm. SCPsAm：人工培养基培养的线虫的表皮蛋白 SCPs from *S. glaseri* nematodes reared on artificial medium；SCPsGm：大蜡螟末龄(5 龄)幼虫培养的线虫的表皮蛋白 SCPs from *S. glaseri* nematodes reared on the last (5th) instar larvae of *Galleria mellonella*. 图 3 同 The same for Fig. 3.

2.3　不同培养基上繁殖的格氏线虫表皮蛋白体内裂解血细胞活性的差异

将不同蛋白注射入大蜡螟后，定时检测血细胞数量，确定表皮蛋白的体内裂解血细胞活性。在正常情况下，大蜡螟的血细胞浓度约为 4.1×10^4/μL；在注射入 PBS 或 BSA 后 24 h 内血细胞浓度无明显变化；注射入人工培养基来源的表皮蛋白 4 h 后，血细胞浓度下降约 12%，但很快恢复正常；注射入大蜡螟来源的表皮蛋白后 30 min 血细胞浓度即出现明显下降，2 h 后血细胞浓度下降约 50%，随后开始逐渐恢复到接近正常的水平(图 3)。

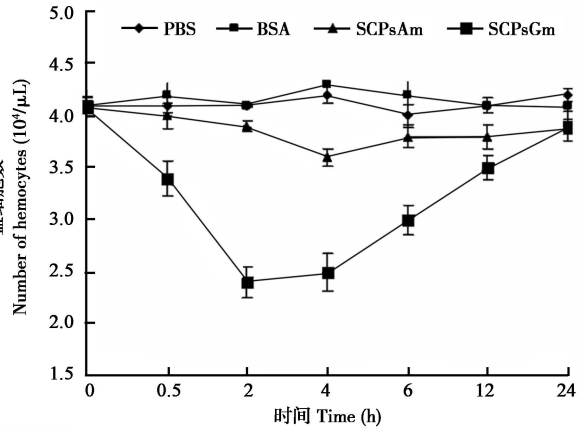

图 3　格氏线虫表皮蛋白体内裂解昆虫血细胞的活性分析

Fig. 3　Analysis of insect hemocyte lytic activity of SCPs from *Steinernema glaseri in vivo*

3　讨论

昆虫病原线虫的培养可采用昆虫和人工培养基培养，在本研究中，我们分别用人工培养基和大蜡螟培养并获得了格氏线虫侵染期幼虫，在提取表皮蛋白后分析了其蛋白成分和裂解血细胞活性的差

异。人工培养基和大蜡螟培养的格氏线虫所得表皮蛋白成分差异明显，大蜡螟来源的表皮蛋白包含的蛋白种类较多，仅有少部分条带为二者所共有，说明表皮蛋白的成分受培养条件的影响较大。Yang 等(1997)利用 4 种不同培养基培养小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae*，发现得到的侵染期线虫在体长、体宽、体重和脂肪酸含量等方面均有不同，说明昆虫病原线虫的生理状态与培养基成分密切相关(Yang *et al.*, 1997)。在不同研究中，采用大蜡螟培养的格氏线虫表皮蛋白的电泳条带情况存在较大差异(Wang and Gaugler, 1999; Li *et al.*, 2007, 2009)。经比较，发现本研究中大蜡螟培养的表皮蛋白电泳条带与前人报道也有不同。Li 等(2007)认为不同时期的表皮蛋白差异是由于格氏线虫脱离其天然寄主日本金龟子，长期在大蜡螟中繁殖传代所引起。本研究中不同培养基接种所用的线虫属同一批次，因此表皮蛋白成分的差异只可能由培养基不同所引起，这也证实了表皮蛋白的表达与外界环境密切相关(Blaxter *et al.*, 1992)。

格氏线虫表皮蛋白能够诱导血细胞凋亡(Li *et al.*, 2009)、降低昆虫体内血细胞浓度并抑制昆虫血细胞吞噬作用(Wang and Gaugler, 1999)。本研究中大蜡螟培养的格氏线虫表皮蛋白也具有体内和体外的裂解血细胞活性，在体外时 6 h 即可完全裂解大蜡螟血细胞，注射到大蜡螟体内 2 h 后也可裂解约 50% 的血细胞。体内实验时血细胞不会完全被降解，且 4 h 后血细胞浓度逐渐恢复，这可能是由于大蜡螟血淋巴中蛋白酶类降解了表皮蛋白，且在血细胞被裂解后大蜡螟能合成新的血细胞补充到血淋巴中(Lavine and Strand, 2002)；另一方面，格氏线虫在进入日本金龟子血腔后 4 - 6 h 后即开始释放共生菌(Wang *et al.*, 1995)。因此，只要在最初的 4 ~ 6 h 能逃避寄主的血细胞免疫，线虫即能在寄主体内存活下来。本研究无论是在体内还是体外实验中，人工培养基培养的格氏线虫表皮蛋白裂解血细胞的活性都较弱，这表明培养基的不同也引起了表皮蛋白免疫抑制活性的变化，当培养于人工培养基时表皮蛋白中具有裂解血细胞活性的成分表达较少或不表达，当培养于大蜡螟时这些活性蛋白成分才会大量表达。结合表皮蛋白电泳条带差异情况可知，在电泳中大蜡螟培养的线虫表皮蛋白比人工培养基来源的表皮蛋白多出的条带应与裂解血细胞活性相关，而且这些蛋白的表达与大蜡螟培养有直接关系。虽然目前还无法确定电泳差异条带中哪些为活性蛋白成分，但正由于这些蛋白存在电泳差异，我们正在尝试采用切胶回收的方式来分别纯化这些差异蛋白，为下一步鉴定研究提供支持。

昆虫匀浆物能诱导 *S. carpocapsae* 分泌丝氨酸蛋白酶和胰凝乳蛋白酶，这两种蛋白是在线虫侵染期表达并参与到侵染寄主的过程中，能够引起昆虫细胞的凋亡或抑制昆虫血细胞包被作用(Balasubramanian *et al.*, 2009; Toubarro *et al.*, 2009)。此外，当 *S. carpocapsae* 培养于 3 种含有昆虫物质的培养基中时，其侵染力都比培养于植物性培养基时高两倍以上(Yang *et al.*, 1997)，虽然该研究未检测表皮蛋白的变化，但昆虫病原线虫上都存在相似的表皮结构，培养基中的昆虫物质可能也诱导了 *S. carpocapsae* 表皮蛋白中活性成分的表达，从而影响了该线虫的侵染力。因此，我们推测线虫体内具有免疫抑制活性的表皮蛋白基因是诱导表达型基因，只有被昆虫或者含昆虫源物质的培养基诱导时才启动表达。

格氏线虫的表皮蛋白能够抑制昆虫免疫反应，在该线虫侵染寄主的过程中发挥了重要的作用，然而至今仍未鉴定出表皮蛋白中具有免疫抑制活性的蛋白成分，该蛋白的编码基因也尚未克隆、作用机理仍不明确。本实验通过研究不同培养基所获得线虫的表皮蛋白，发现其成分中具有裂解血细胞活性的蛋白为诱导表达型蛋白，这为分离鉴定表皮蛋白中的活性蛋白创造了条件，也为进一步研究线虫与昆虫间的相互关系、线虫抑制昆虫免疫的作用机理奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

Adams BJ, Nguyen KB, 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler R ed. Entomopathogenic Nematology. CABI, New York. 1 - 34.

Balasubramanian N, Hao YJ, Toubarro D, Nascimento G, Simoes N, 2009. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Int. J. Parasitol.*, 39(9): 975 - 984.

Blaxter ML, Page AP, Rudin W, Maizels RM, 1992. Nematode surface coats: actively evading immunity. *Parasitol. Today*, 8 (7): 243 - 247.

Burnell AM, Stock SP, 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts: lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 (1): 31 - 42.

Gaugler R, Lewis E, Stuart R, 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109 (4): 483 - 489.

Hoffmann JA, 1995. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.*, 7(1): 4 – 10.

Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198(1): 97 – 105.

Kaya H, Gaugler R, 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38(1): 181 – 206.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1295 – 1309.

Li XY, Cowles EA, Cowles RS, Gaugler R, Cox-Foster DL, 2009. Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 165(2): 162 – 169.

Li XY, Cowles RS, Cowles EA, Gaugler R, Cox-Foster DL, 2007. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int. J. Parasitol.*, 37(3 – 4): 365 – 374.

Shamseldean MM, Platzer E, Gaugler R, 2007. Role of the surface coat of *Romanomermis culicivorax* in immune evasion. *Nematology*, 9(1): 17 – 24.

Toubarro D, Lucena-Robles M, Nascimento G, Costa G, Montiel R, Coelho AV, Simoes N, 2009. An apoptosis-inducing serine protease secreted by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Int. J. Parasitol.*, 39(12): 1319 – 1330.

Wang Y, Campbell JF, Gaugler R, 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 66(2): 178 – 184.

Wang Y, Gaugler R, 1999. *Steinernema glaseri* surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Biol. Control*, 14(1): 45 – 50.

Wang Y, Gaugler R, Cui L, 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *J. Nematol.*, 26(1): 11 – 18.

Yang H, Jian H, Zhang S, Zhang G, 1997. Quality of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* produced on different media. *Biol. Control*, 10(3): 193 – 198.

（责任编辑：袁德成）